



MD 4234 C1 2014.01.31

## REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală(11) **4234** (13) **C1**  
(51) Int.Cl: *C12N 1/14* (2006.01)  
*C12R 1/77* (2006.01)  
*C07F 15/06* (2006.01)  
*C12N 9/58* (2006.01)

## (12) BREVET DE INVENȚIE

<p>(21) Nr. depozit: a 2012 0124 (22) Data depozit: 2012.12.20</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2013.06.30, BOPI nr. 6/2013</p>
<p>(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD</p> <p>(72) Inventatori: DESEATNIC-CILOCI Alexandra, MD; TIURINA Janetta, MD; BOLOGA Olga, MD; COROPCEANU Eduard, MD; CLAPCO Steliana, MD; STRATAN Maria, MD; LABLIUC Svetlana, MD; DVORNINA Elena, MD; BIVOL Cezara, MD; RUDIC Valeriu, MD; BULHAC Ion, MD</p> <p>(73) Titulari: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD</p>	

(54) Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Fusarium gibbosum*  
CNMN-FD-12

(57) Rezumat:

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la un mediu de cultivare submersă a tulpinii de fungi *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12 și poate fi utilizată pentru stimularea sintezei proteazelor neutre.

Conform invenției, mediul nutritiv conține, în % de masă: făină de porumb – 2,0; făină de soia – 1,0; CaCO<sub>3</sub> – 0,2; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0,1; [Co(DH)<sub>2</sub>·(Thio)<sub>2</sub>]F[PF<sub>6</sub>]<sub>n</sub>H<sub>2</sub>O – 0,0010... 0,0015 și apă – restul, având pH-ul 6,25.

Revendicări: 1

MD 4234 C1 2014.01.31

**(54) Nutrient medium for cultivation of fungal strain *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12**

**(57) Abstract:**

The present invention relates to 5 Claims: 1 2  
 biotechnology, particularly to a medium for  
 submerged cultivation of fungal strain  
*Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12 and may 10  
 be used to stimulate the synthesis of neutral  
 proteases.

According to the invention, the nutrient 15  
 medium comprises, in mass %: corn flour –  
 2.0, soy flour – 1.0; CaCO<sub>3</sub> – 0.2; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> –  
 0.1; [Co(DH)<sub>2</sub>·(Thio)<sub>2</sub>]F[PF<sub>6</sub>]<sub>n</sub>H<sub>2</sub>O –  
 0.0010...0.0015 and water – the rest, having  
 the pH – 6.25.

**(54) Питательная среда для культивирования штамма грибов *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12**

**(57) Реферат:**

Изобретение 1 относится к 5 Согласно 2 изобретению,  
 биотехнологии, в частности к среде для 5  
 глубокого культивирования штамма 2  
 грибов *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12 и 10 питательная среда содержит, в масс. %:  
 может быть использовано для кукурузную муку – 2,0; соевую муку – 1,0;  
 стимулирования синтеза нейтральных CaCO<sub>3</sub> – 0,2; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0,1;  
 протеаз. 15 [Co(DH)<sub>2</sub>·(Thio)<sub>2</sub>]F[PF<sub>6</sub>]<sub>n</sub>H<sub>2</sub>O – 0,0010...  
 0,0015 и воду – остальное, имея pH - 6,25.  
 П. формулы: 1

**Descriere:**

Invenția se referă la biotehnologie, în particular, la un mediu de cultivare submersă a tulpinii de fungi *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12 – producător al unui complex enzimatic hidrolitic cu activitate proteolitică, xilanazică și  $\beta$ -glucozidazică ce realizează hidroliza concomitentă a proteinelor și polizaharidelor din componența țesuturilor vegetale și poate fi utilizată în industria microbiologică pentru obținerea preparatelor enzimatice hidrolitice complexe cu largi utilizări în industria alimentară, și anume la prelucrarea cărnii și a produselor lactate, la producerea berii, sucurilor și conservelor din fructe și legume, la prepararea furajelor concentrate, precum și în farmaceutică și medicină.

Pentru cultivarea tulpinilor fungice producătoare de enzime proteolitice se utilizează medii, care conțin ca parte minerală diferite modificări ale mediului Czapek și inductori ai sintezei proteazelor (ingrediente naturale cu conținut înalt de proteine – făină de fasole, făină de porumb, tărâțe de grâu etc.) și, în dependență de particularitățile fiziologo-biochimice ale tulpinii, diferiți biostimulatori [1].

În calitate de cea mai apropiată soluție se consideră mediul nutritiv pentru cultivarea submersă a tulpinii *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12 cu componență minerală semnificativ simplificată, (%): făină de porumb – 2,0; făină de soia – 1,0;  $\text{CaCO}_3$  – 0,2;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 0,1; restul apă de robinet, pH-ul inițial al mediului – 6,25 [2].

Dezavantajul constă în faptul că mediul nu asigură realizarea pe deplin a potențialului biosintetic al tulpinii și biosinteza enzimelor proteolitice nu atinge valoarea maximă.

Problema tehnică pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui mediu nutritiv pentru cultivarea submersă a tulpinii de fungi *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12, utilizarea căruia asigură sporirea activității proteazelor neutre.

Esența invenției constă în aceea că pentru cultivarea submersă a tulpinii de fungi *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12 se propune o variantă nouă de mediu nutritiv care suplimentar la componentele mediului proxim, în calitate de stimulator include compusul coordinativ al Co(III) cu dioxime și anioni fluorurați  $\text{F}^-$  și  $[\text{PF}_6]^-$  –  $[\text{Co}(\text{DH})_2 \cdot (\text{Thio})_2] \cdot \text{F}[\text{PF}_6] \cdot n\text{H}_2\text{O}$  în următorul raport cantitativ al elementelor, % de masă: făină de porumb – 2,0; făină de soia – 1,0;  $\text{CaCO}_3$  – 0,2;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 0,1;  $[\text{Co}(\text{DH})_2 \cdot (\text{Thio})_2] \cdot \text{F}[\text{PF}_6] \cdot n\text{H}_2\text{O}$  – 0,0010...0,0015, restul apă de robinet, pH-ul inițial al mediului fiind de 6,25.

Rezultatul tehnic al invenției constă în reducerea duratei de cultivare a tulpinii de fungi *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12 cu 24 ore și sporirea biosintezei proteazelor neutre cu 56,36... 58,92% față de cea mai apropiată soluție, cu păstrarea nivelului de activitate a celorlalte componente enzimatice ale complexului (proteaze acide, xilanaze,  $\beta$ -glucozidaze) sintetizat de tulpina-producător.

Efectul biostimulator al compușilor coordinativi se datorează proprietăților oligoelementului Co(III) și altor grupe active de substanțe din componența compusului coordinativ de a se implica activ în coordonarea și desfășurarea reacțiilor metabolice în celulă.

*Exemple de realizare a invenției*

*Exemplul 1*

Tulpina *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12 a fost cultivată în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 0,75 l, care conțineau 0,2 l mediu nutritiv cu următoarea compoziție, % de masă: făină de porumb – 2,0; făină de soia – 1,0;  $\text{CaCO}_3$  – 0,2;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 0,1;  $[\text{Co}(\text{DH})_2 \cdot (\text{Thio})_2] \cdot \text{F}[\text{PF}_6] \cdot n\text{H}_2\text{O}$  – 0,0015; restul apă de robinet; pH-ul inițial al mediului 6,25. Mediul nutritiv se însămânțează cu suspensie de spori și miceliu în cantitate de 5% v/v, obținută prin spălare cu apă distilată sterilă a culturii de 12...14 zile, crescută pe suprafețe înclinate de malț-agar. Cultivarea s-a realizat în condiții de agitare continuă (180 rot/min), timp de 120 ore, la temperatura de 28°C.

Activitatea proteazelor neutre (pH-ul 7,4) ale micromicetei în variantele optimizate ale mediului, determinată în lichidul cultural prin metoda Anson după acțiunea asupra cazeinatului de sodiu, s-a înregistrat în ziua a V-a de cultivare a tulpinii, variind în limitele 45,02...53,13 U/ml în funcție de concentrația aplicată a compusului coordinativ, cu manifestarea maximă la concentrația de 0,0015%, comparativ cu 33,43 U/ml (ziua a VI-a de cultivare – ziua manifestării maximumului de biosinteză a tulpinii pe mediul din cadrul celei mai apropiate soluții), sporul activității constituind 58,92% (vezi tabelul).

# MD 4234 C1 2014.01.31

4

Activitatea  $\beta$ -glucozidazelor și xilanazelor, determinată prin dozarea cantității de zaharuri reducătoare eliberate la acțiunea asupra substraturilor specifice – n-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranozid și xilan din mesteacăn, a constituit 2,29 U/ml și, respectiv, 10,06 U/ml, ce prezintă nivelul variantei martor.

5

Tabel

Modificarea activității proteazelor neutre la cultivarea micromicetei *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12 în prezența compusului coordinativ al cobaltului (III) cu anioni fluorurați (cultivarea în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 0,75 l, cu 0,2 l mediu nutritiv, 28°C)

10

Compusul coordinativ (CC)	Concentrația CC %	Activitatea proteolitică			
		Ziua a V-a		Ziua a VI-a	
		U/ml	% f/m z/6	U/ml	% f/m z/6
[Co(DH) <sub>2</sub> (thio) <sub>2</sub> ]F[PF <sub>6</sub> ] <sub>n</sub> H <sub>2</sub> O	0,0005	46,34	138,62	31,61	94,55
	0,0010	47,67	142,59	39,55	118,31
	0,0015	53,13	158,92	40,72	121,80
	0,0020	45,02	134,67	37,07	110,90
Mediul proxim	-	25,10	100	33,43	100

Calculule sunt efectuate în raport cu maximumul de biosinteză al mediului proxim – ziua a VI-a de cultivare.

### Exemplul 2

15

Tulpina *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 a fost cultivată în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 0,5 l care conțineau 0,1 l mediu, la temperatura de 30°C, în rest condițiile sunt echivalente exemplului 1.

20

Activitatea maximă a proteazelor neutre s-a înregistrat în lichidul cultural al producătorului în ziua a V-a de cultivare, constituind 52,97 U/ml în comparație cu 33,87 U/ml în varianta proxim (ziua a VI-a de cultivare), depășind varianta proxim cu 56,36%.

25

Sinteza [Co(DH)<sub>2</sub>(Thio)<sub>2</sub>]F[PF<sub>6</sub>]. La 0,17 g (0,001 mol de CoF<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O dizolvați în 15 ml apă se adaugă 0,23 g (0,002 mol) dimetilglioximă (dizolvată în 20 ml metanol), 0,15 g (0,002 mol) tiocarbamidă și 0,18 g (0,001 mol) KPF<sub>6</sub> (dizolvate în 15 ml amestec CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O). Amestecul obținut se fierbe ~10 min, după care se filtrează și se lasă pentru evaporare lentă la temperatura camerei. Din soluție se sedimentează cristale cu formă piramidală de culoare vișinie. Randamentul: ~45%. Substanța este solubilă în apă, alcool metilic, etilic, dimetilformamidă.

30

Găsit, %: Co 11.08; C 22.73; H 4.21; N 21.32

Pentru C<sub>20</sub>H<sub>44</sub>Co<sub>2</sub>F<sub>7</sub>N<sub>16</sub>O<sub>8</sub>S<sub>4</sub>P

Calculat, %: Co 11.26; C 22.95; H 4.24; N 21.41

În spectrul UV-Vis al complexului sunt prezente două benzi. Prima – la 235 nm este atribuită transferului  $\pi$ - $\pi$  în cadrul grupării Co(DioxH)<sub>2</sub>, iar a doua – la 336 nm este caracteristică moleculelor de tiocarbamidă coordonate.

35

Prezența benzilor de absorbție  $\nu(\text{O-H}\cdots\text{O})=1771$ ,  $\nu(\text{C=N})=1537$ ,  $\nu(\text{NO})_{\text{ioniz.}}=1232$  și 1092,  $\gamma(\text{OH})=985$ ,  $\delta(\text{CNO})=740$ ,  $\nu_{\text{as}}(\text{Co-N})=515$  și  $\nu_{\text{s}}(\text{Co-N})=434$  cm<sup>-1</sup> în spectrul IR indică coordonarea dioximei la atomul central. Frecvențele  $\nu_{\text{as}}(\text{NH})=3303$ ,  $\nu_{\text{s}}(\text{NH})=3215$ ,  $\delta(\text{NH}_2)=1628$ ,  $[\nu(\text{CN})+\nu(\text{CS})+\delta(\text{HNC})]=1058$  cm<sup>-1</sup> indică prezența tiocarbamidei coordonate. Benzile la 558 și 836 cm<sup>-1</sup> pot fi atribuite anionului hexafluorofosfat.

**(56) Referințe bibliografice citate în descriere:**

1. Грачева И. М. Технология ферментных препаратов. Москва, Агропромиздат, 1975, p. 325-327
2. MD 4186 B1 2012.11.30

**(57) Revendicări:**

Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de fungi *Fusarium gibbosum* CNMN-FD-12, care conține, în % de masă: făină de porumb – 2,0, făină de soia – 1,0, CaCO<sub>3</sub> – 0,2, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0,1 și apă – restul, având pH-ul 6,25, **caracterizat prin aceea că** suplimentar conține [Co(DH)<sub>2</sub>·(Thio)<sub>2</sub>]F[PF<sub>6</sub>]<sub>n</sub>·nH<sub>2</sub>O în concentrație de 0,0010... 0,0015% de masă.

**Șef secție:**

IUSTIN Viorel

**Examinator:**

LUPAȘCU Lucian

**Redactor:**

LOZOVANU Maria